第 22 卷 第 4 期　　昆 虫 学 报　　Vol. 22, No. 4
1979 年 11 月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　Nov., 1979

国产植物中蜕皮激素的分离鉴定和对家蚕生理活性的试验*

江苏省植物研究所植化室激素组
江苏省蚕业研究所生理室激素组

摘要 (1) 通过 107 种植物对家蚕的蜕皮活性试验,发现唇形科植物野芝麻(*Lamium barbatum* S. et Z.)是一种新的含蜕皮激素的植物。蜕皮激素收得率是 0.029%,熔点 239—242℃, TLC Rf 0.5—0.6(黄绿色),并经光谱分析证明为 β-蜕皮激素。

(2) 从资源丰富的植物土牛膝 (*Achyranthes bidentata* Bl.) 中提取了 β-蜕皮激素,并进行了蚕用试验与推广应用研究,证明活性及效果稳定,并提出了简易的制作生产方法。

(3) 在试验中发现从川牛膝 (*Cyathula capitata* Moquin-Tandon) 根提取的 Cyasterone 给蚕添食大剂量(5 微克/头或以上)时蜕变为幼虫-蛹混合型,而添食小剂量(1.5 微克/头)蜕变为正常的蛹。

一、前　　言

自 1966 年从植物界找到第一个植物性蜕皮激素百日青甾酮 A (Ponasterone A) 以来,近 10 多年中对这一类新的天然生理活性物质的研究发展很快。国外试验过的植物超过 1,200 种,其中高等植物就将近 200 个科、800 个属以上,已提取分离鉴定出蜕皮激素及类似物达 40 余种。植物界蜕皮激素含量高的种类可达植物干重的 1% 或更高,比最初从昆虫或蟹、虾甲壳动物提取的高出千百倍以上,从而为蜕皮激素的生产和应用提供了基础。

近几年中我国已将植物性蜕皮激素用于调节蚕儿生长发育和增产蚕丝 (中国农林科学院蚕桑服务组等, 1977),对发展蚕丝生产起了积极作用。国内最近从露水草 (*Cyanotis arachnoides*) 提取蜕皮激素收得率达植物干重的 1.2%,根部达 2.9% (聂瑞麟等, 1978)。虽然如此,由于我国植物资源丰富、蚕区广大,应当通过试验对蜕皮激素在植物科、属中的分布情况有所了解。人们也希望找到更多的含蜕皮激素的植物,便于各蚕区就地取材,就地加工,推广应用。此外,探讨这类化学成分对植物自身的功能、植物与昆虫的关系等问题也为学科发展积累了资料。

关于植物性蜕皮激素筛选试验在国内尚少报道。国外较早的生测方法有昆虫幼虫游离腹部注射法,和二化螟浸泡法;化学分析方法有高压液体色谱法。本试验初期也曾用家蝇幼虫游离腹部注射法,从上海昆虫研究所引进家蝇,但试验中发现向游离腹部注射 β-蜕皮激素纯品是成功的,而注射植物提取物由于杂质影响容易造成"死蛆"。因此采用了家蚕生物测定与薄层层析相结合的方法。

本文于 1977 年 12 月收到。

* 江苏金坛昆虫激素研究所参加了部分工作。上海有机化学研究所 103 组赠给平卧川牛膝甾酮对照样品和红外光谱图,上海医药工业研究院代做核磁,一并致以谢意。

二、实 验 方 法

1. 一般程序　将植物的乙醇提取物（以下简称"药液"）给五龄蚕添食，观察能否比对照蚕缩短龄期，有活性的药液再进行薄层层析，观察能否显示出与 β-蜕皮激素标准品相应的斑点，其他的蜕皮激素类似物薄层显示情况主要参考 Horn 1971 的记述。试验中重复得到正结果的则进一步对蜕皮激素提取分离。

2. 药液制备　植物原料在 70℃ 以下干燥后磨碎，称取 20 克用酒精迴流提取 2 次，每次 30 分钟，提取液合并后回收酒精，剩余物用少量水搅拌煎煮 2 次，过滤，滤液用少许酒精调节到 20 毫升，每毫升药液相当于干植物 1 克。

3. 添食方法　挑选健康的 5 龄蚕儿（未分雌、雄）100 头作试验蚕，量取药液 0.4 毫升* 加适量的水稀释并均匀喷布在一定量桑叶上给蚕添食。如果蚕儿对某种药液产生忌避就迟喂新鲜桑叶，尽可能使蚕儿吃净有药液的桑叶。另以清水对照。

4. 确定蜕皮活性的标准　添食药液后逐批记录蚕的成熟时间，计算平均五龄经过，凡试验蚕比对照蚕龄期缩短 5 小时以上的表示活性显著，不足 5 小时的表示活性微弱，不缩短的表示无活性。

5. 薄层层析　层析硅胶（180 目筛孔，上海五四农场产品）与 1% 羧甲基纤维素钠调匀制板，未活化。展开溶剂：醋酸乙酯:乙醇（8:2）。显色剂：香格兰素 3 克溶于 100 毫升 95% 乙醇，加硫酸 1 克。

6. 土牛膝蜕皮激素的蚕用试验　从土牛膝茎、叶提取的 β-蜕皮激素纯品按每头蚕 2 微克的剂量添食。提取的 β-蜕皮激素每公斤原料制成制剂 100 毫升，取 10 毫升供 1 张蚕种添食（含量 0.05% 左右）。

7. 野芝麻 β-蜕皮激素的提取　采集 6 月开花的植物全株晒干磨碎，称取 1712 克用酒精迴流提取数次，提取液合并瓶回收酒精，剩余物溶于热水，滤去不溶物，滤液用正丁醇提取数次，减压回收正丁醇得总提取物 11 克，拌入 13 克中性层析氧化铝，干燥后柱层析分离，先用醋酸乙酯洗脱得到一种结晶性固体，熔点 136—134℃，与洋地黄毒甙有沉淀反应，与 β-谷甾醇混合熔点不下降，红外光谱也一致。洗脱溶媒颜色减退后更换醋酸乙酯：无水乙醇（9:1）洗脱，回收溶媒后得针状结晶共计 500 毫克。熔点 235℃，在甲醇-醋酸乙酯中重结晶数次熔点升至 239—242℃。

三、实 验 结 果

1. 总的情况　表 1 记载了 107 种植物的蜕皮活性。表明唇形科植物野芝麻（*Lamium barbatum*），多花筋骨草（*Ajuga multiflora*）活性显著，在薄层层析上也显示出与 β-蜕皮激素标准品一致的斑点。野芝麻是新发现的一种蜕皮激素植物资源，从全株提取蜕皮激素得率为 0.029%，家蚕试验表明有蜕皮活性（表 2），证明确是野芝麻的有效活性物质。多花筋骨草是从已知的属中找到的新种类。番杏科植物海马齿（*Sesuvium portulacastrum*）

---

* 按植物蜕皮激素含量一般较高水平的千分之一计算，0.4 毫升药液含量应为 0.4 毫克（400 微克），每头蚕的剂量是 4 微克（=400 微克/100 头），是目前农村养蚕使用蜕皮激素剂量的 2 倍，如果这样高的剂量不表现活性则表明该植物不含蜕皮激素，或即使含有量也不高。

表 1 国产 107 种植物对蚕的蜕皮活性试验

科 名	植 物 名	学 名	部位	比对照蚕五龄期平均缩短小时
海金沙科	海金沙	*Lygodium japonicum*	地上	5.1
凤尾蕨科	蕨	*Pteridium aquilinum* var. *latius culum*	地上	0.2
蹄盖蕨科	华盖蕨	*Athyrium* sp.	根茎	5.0
乌毛蕨科	乌毛蕨	*Blechnum orientale*	根茎	1.0
鳞毛蕨科	中华鳞毛蕨	*Dryopteris chinensis*	根茎	0.2
水龙骨科	有柄石韦	*Pyrrosia petiolosa*	全草	5.4
木麻黄科	木麻黄	*Casuarina equisetifolia*	叶	0
松科	黑松	*Pinus thunbergii*	叶	0.7
柏科	侧柏	*Biota orientalis*	叶	1.4
	桧	*Sabina chinensis*	叶	2.0
胡桃科	枫杨	*Pterocarya stenoptera*	叶	2.0
山毛榉科	麻栎	*Quercus acutissima*	叶	2.7
	栓皮栎	*Q. variabilis*	叶	2.5
桑科	构树	*Broussonetia papyrifera*	叶	1.5
	柘	*Cudrania tricuspidata*	叶	0.9
蓼科	蓼	*Polygonum* sp.	全草	2.2
苋科	喜旱莲子草	*Alternanthera philoxcroides*	地上	3.4
	苋菜	*Amaranthus magostanus*	全草	1.0
	刺苋	*A. spinosus*	全草	1.7
	千日红	*Gomphrena globosa*	全草	2.7
	川牛膝	*Cyathula capitata*	根	15
	牛膝	*Achyranthes bidentata*	茎叶	16
商陆科	商陆	*Phytollacca acinosa*	根	1.1
毛茛科	威灵仙	*Clematis chinensis*	地上	4.4
	毛茛	*Ranuculus japonicus*	地上	0
金缕梅科	枫香	*Liquidambar formosana*	叶	1.5
豆科	决明	*Cassia tora*	地上	5.0
	黄檀	*Dalbergia hupeana*	叶	6.0
金丝桃科	地耳草	*Hypericum japonicum*	地上	1.4
紫树科	喜树	*Camptotheca acuminata*	叶	2.9
八角枫科	八角枫	*Alangium chinense*	叶	1.0
五加科	细柱五加	*Acanthopanax gracilistylus*	地上	1.9
伞形科	胡萝卜	*Daucus carota*	地上	1.0
萝藦科	萝藦	*Metaplexis japonica*	地上	3.4
旋花科	番薯	*Ipomoea batatas*	地上	0.9
马鞭草科	莸	*Caryopteris nepetaefolia*	叶	4.0
	臭牡丹	*Clerodendron bungei*	叶	5.0
	海州常山	*C. trichotomum*	枝叶	4.0
	马鞭草	*Verbena officinalis*	枝叶	3.4
	紫株	*Vitex agnus-castus*	枝叶	2.5
	牡荆	*V. cannabifolia*	枝叶	2.0
	大叶蔓荆	*V. trifolia* L. var. *simplicifolia*	枝叶	0
景天科	垂盆草	*Sedum sanmentosum*	全草	9.0
	爪瓣景天	*S. onychopetalum*	全草	3.0
木犀科	女贞	*Ligustrum lucidum*	叶	4.2
	腊树	*Fraxinus chinensis*	叶	3.0

续表 1

科名	植物名	学名	部位	比对照蚕五龄期平均缩短小时
半边莲科	半边莲	*Lobelia chinensis*	全草	5.0
藜科	藜	*Chenopodium album*	全草	5.0
	小叶灰菜	*C. serotinum*	地上	0
	土荆芥	*C. ambrosioides*	地上	2.3
	地肤	*Kochia scoparia*	全草	5.0
苦木科	臭椿	*Ailanthus altissima*	果实	5.7
唇形科	牛至	*Origanum vulgare*	全草	3.0
	白苏	*Perilla frutescens* var. *crispa*	地上	1.0
	糙苏	*Phlomis umbrosa* var. *ovalifolia*	地上	3.4
	夏枯草	*Prunella vulgaris*	地上	3.5
	龟叶草	*Rabdosia macrophylla*	地上	3.4
	香薷	*Klshohzi ciliata*	全草	1.3
	野芝麻	*Lamium barbatum*	全草	15
	益母草	*Leonurus sibricus*	地上	24
	地笋	*Lycopus lucidus* Turcz. var. *hirtus*	地上	2.2
	石荠苧	*Mosla punctata*	地上	1.8
	多花筋骨草	*Ajuga multiflora*	全草	11
	雪见草	*Salvia plebeia*	全草	2.0
	丹参	*S. miltiorrhiza*	全草	3.0
	耳挖草	*Scutellaria indica*	全草	4.0
	香茶菜	*Plectranthus glaucocalyx*	全草	5.0
	风轮菜	*Calamintha confinis*	全草	3.0
	活血丹	*Glechoma hederacea*	全草	4.0
玄参科	山萝花	*Melampyrum roseum*	地上	0.7
	泡桐	*Paulownia fortumei*	叶	0.7
	宁波玄参	*Scrophularia ningpoensis*	根	3.0
	阴行草	*Siphonostegia chinensis*	全草	2.0
茜草科	黄毛耳草	*Oldenlandia chrysotricha*	全草	1.0
	鸡矢藤	*Paederia scandens*	地上	0
番杏科	海马齿	*Sesuvium portulacastrum*	全草	18
大戟科	乌桕	*Sapium sebiferum*	叶	1.0
	一叶萩	*Securinega suffruticosa*	叶	0
	重阳木	*Bischofia javanica*	叶	5.3
漆树科	盐肤木	*Rhus chinensis*	叶	0.6
槭树科	五角枫	*Acer mono*	叶	1.0
七叶树科	七叶树	*Aesculus chinensis*	叶	3.0
无患子科	龙眼	*Euphoria longan*	花	1.9
葡萄科	乌蔹莓	*Cayratia japonica*	全草	0
椴树科	扁担杆子	*Grewia biloba*	叶、果实	2.0
	南京椴	*Tilia migueliana*	叶	1.8
锦葵科	木芙蓉	*Hibiscus mulabilis*	叶	2.8
梧桐科	悬铃木	*Platanus acerifolia*	叶	1.3
蔷薇科	梅	*Prunus mume*	叶	5.3
	茅莓	*Rubus parvifolius*	叶	5.3
忍冬科	接骨木	*Sambucus racemosa*	叶	5.4
木通科	木通	*Akebia quinata*	叶	5.2

续表 1

科名	植物名	学名	部位	比对照蚕五龄期平均缩短小时
菊科	黄花蒿	*Artemisia annua*	地上	0
	茵陈蒿	*A. capillaris*	地上	0.3
	白莲蒿	*A. sacrorum*	地上	3.7
	东风菜	*Doellingeria scaber*	地上	24
	术	*Atractylodes lancea*	根	1.0
	婆婆针	*Bidens bipinnata*	全草	2.5
	无名精	*Carposium abrotanoides*	地上	0
	漏芦	*Echinops grijisii*	地上	2.0
	一年蓬	*Erigeron annuus*	根	1.8
	白鼓丁	*Eupatorium lindleyanum*	地上	3.2
	一枝黄花	*Solidago decurens*	地上	2.2
	苍耳	*Xanthium strumarium*	地上	0.4
	野菊	*Chysanthemum indicum*	叶	5.3
禾本科	牛筋草	*Eleusine indica*	全草	2.5
天南星科	异天南星	*Arisaema ambiguum*	鳞茎	6.0

表 2 野芝麻 (*Lamium barbatum*) β-蜕皮激素活性鉴定

试验区别	剂量 (微克/头)	平均五龄经过 (日:时)	头批上簇率 (%)
1 区	2	7:2	90
2 区	4	7:0	90
对照	0	7:13	45

(Banerji, 1971),苋科植物土牛膝 (*Achyranthes bidentata*) (小川俊太郎等, 1971), 川牛膝 (*Cyathula capitata*) (Takemoto, 1967) 等在我国都很丰富,提取蜕皮激素的情况归纳于表 3。

此外垂盆草 (*Sedum sarmentosum*), 半边莲 (*Lobelia chinensis*) 及东风菜 (*Doellingeria scaber*) 等虽能使蚕的五龄期缩短, 但在薄层层析板上却不能显示出蜕皮激素斑点。其中东风菜的药液给蚕添食后往往在簇中出现死蚕(占 40—60%), 剩下的活蚕仅结一个较小的薄茧,证明东风菜对蚕有一定毒性。

2. 土牛膝在蚕业生产上的应用 土牛膝的根已知含 β-蜕皮激素 (小川俊太郎等, 1971),也是我国的中药材,但是它的茎、叶至今尚未充分利用。试验证明土牛膝的茎叶有蜕皮活性后提取了蜕皮激素,从熔点、混合熔点、紫外及红外光谱、质谱分析等证明是 β-蜕皮激素。土牛膝的 β-蜕皮激素可用作蚕的催熟剂、上簇整齐剂及五龄蚕暴发疾病时的应急剂可挽回部分减产。为了降低生产成本,制备了 β-蜕皮激素粗制品,与上述的 β-蜕皮激素纯品进行比较试验, 证明两种产品具有同等效果。在室内试验有效的基础上又在无锡、吴江等地,通过 2800 张蚕种的放大试验证明两种产品一样有效,由此确定了土牛膝 β-蜕皮激素制剂的简易制作生产方法(江苏省植物研究所植化室激素组, 1978)。

近两年来江苏省溧阳县戴北公社采集当地的土牛膝茎、叶用水煎煮方法,按 2 两干草供 1 张蚕种的药量给五龄蚕添食也得到较满意的效果。

表 3 国产若干种植物的蜕皮激素含量情况

植物名	学名	科名	来源	部位	采收月份	得率 (%)	熔点 (℃)	Rf 值
野芝麻	*Lamium barbatum*	唇形科	江苏南京野生	全株	5	β-蜕皮激素 0.029	239—242	0.5—0.6 黄绿
多花筋骨草	*Ajuga multiflora*	唇形科	江苏灌云野生	全株	5	薄层层析鉴定含β-蜕皮激素，提取未做		
紫背金盘	*A. nipponensis*	唇形科	江苏宜兴野生	全株	5	β-蜕皮激素 0.01—0.02	238—240	0.5—0.6 黄绿
			浙江衢县上方	全株	5	β-蜕皮激素 0.06	238—240	0.5—0.6 黄绿
牛膝	*Achyranthes bidentata*	苋科	江苏苏州栽培	茎叶	8	β-蜕皮激素 0.02	240—243	0.5—0.6 黄绿
			南京野生	茎叶	9	β-蜕皮激素 0.05—0.06	240—242	0.5—0.6 黄绿
			镇江野生	茎叶	8	β-蜕皮激素 0.05	238—240	0.5—0.6 黄绿
			无锡野生	茎叶	8	β-蜕皮激素 0.05	240—242	0.5—0.6 黄绿
			溧阳野生	茎叶	8	β-蜕皮激素 0.05	236—239	0.5—0.6 黄绿
			南京野生	根	9	β-蜕皮激素 0.08	240—242	0.5—0.6 黄绿
川牛膝	*Cyathula capitata*		云南购进	根		平卧川牛膝甾酮 0.04	164—166	0.8 红变棕
海马齿	*Sesuvium portulacastrum*	番杏科	海南岛三桠	全株	8	β-蜕皮激素 0.09—0.1	238—241	0.5—0.6 黄绿

我们对土牛膝逐月采集提取蜕皮激素证明5、6月份收得量仅为干植物重量的0.02%，而9、10月份的收得量可增高至0.05—0.06%。江苏南京、镇江、无锡、溧阳四个地区产的土牛膝基本一致。

3. 野芝麻植物中 β-蜕皮激素的鉴定　从野芝麻全株提取的蜕皮激素熔点在精制以前为235℃，用甲醇-醋酸乙酯重结晶数次升至239—242℃，与β-蜕皮激素标准品混合熔点不下降，硅胶薄层层析 Rf 值0.5—0.6处呈暗绿色至黄绿色斑点，也与标准品一致。

光谱分析数据如下：

紫外吸收光谱：$_{max}^{EtoH}$ 243 毫微米（log ε 4.306），$\lambda_{max}^{EtoH,HCl}$ 244（log ε 4.076），298 毫微米（log ε 3.946）。

红外吸收光谱：ν_{max}^{KBr}2.95 微米$^{-1}$（OH），6.10 微米$^{-1}$（α，β-不饱和酮）。

质谱：M^{f}480，m/e363(480—117)，345(363—18)，327(345—18)，309(327—18)，99(117—18)，81(99—18)。

核磁共振谱：（仪器60兆周，内标准 TMS，吡啶作溶剂）：δ1.09(C-19，CH_3)，1.23(C-18，CH_3)，1.41(C-26/C-27，$2CH_3$)，1.62(C-21，CH_3)，3.40—4.40范围有钝峰，重水交换后消失。根据以上光谱与文献报道的数据完全一致。证明野芝麻（*Lamium barbatum*）植物中的蜕皮激素是β-蜕皮素（Horn，1971）。

4. 家蚕幼虫-蛹混合型试验　自云南省药品检验所提供的川牛膝根提取的平卧川牛膝甾酮（Cyasterone），熔点164—166℃，硅胶薄层层析 Rf 值0.8（红变棕），红外光谱与平卧川牛膝甾酮标准品完全重合。试验中发现给五龄蚕添食大剂量（5微克/头或以上）发生幼虫-蛹混合型，添食小剂量（1.5微克/头）则蜕变为正常的蛹（表4）。

表4　平卧川牛膝甾酮对蚕的添食试验
（幼虫-蛹混合型试验）

试验日期	试验蚕头数	蚕　品　种	剂　量（微克/头）	五龄经过比对照蚕缩短小时	幼虫-蛹混合型数
1977. 7.30	100	东34×603	5	10	41
9.4	100	苏3×4	5	8	53
9.4	100	苏3×4	6	7	85
10.4	100	东肥×华合	1.5	5	0

四、讨　论

1. 本文证明用家蚕生物测定与薄层层析相结合的方法对植物的蜕皮激素成分进行筛选基本是成功的。野芝麻中β-蜕皮激素是一个新的发现。

2. 土牛膝在我国山区及农村资源丰富，且含有一定量的蜕皮激素，提取方法简便，成本低廉，活性效果稳定。华南沿海生长的海马齿含β-蜕皮激素0.1%左右，华南蚕区可以推广应用。如果各地区都有了适合在本地区推广的蜕皮激素植物种类，则人工控制养蚕法会更快的普及，对发展蚕丝生产有积极的作用。

3. 本试验发现给蚕添食大剂量的平卧川牛膝甾酮可使蚕的幼虫变成幼虫-蛹混合型

以及发现东风菜的提取物对蚕有较大的毒性等。为研究其它昆虫生理活性物质提供了线索。

参　考　文　献

中国农林科学院蚕桑科技站等 1977 应用植源性蜕皮激素调节蚕儿生长发育和增产蚕丝的研究。昆虫学报 **20**: 147—54.

江苏省植物研究所植化室激素组 1978 植物性蜕皮激素的提取分离方法。昆虫知识 **15**: 189—91.

聂瑞麟等 1978 露水草植物中蜕皮激素的分离和鉴定。化学学报 **36**: 137—41.

小川俊太郎等 1971 牛膝の成份研究(第8报)植物中的昆虫变态活性物质(补遗Xの2). 药学杂志 **91**: 916—20.

Banerji, A. et al. 1971 Isolation of ecdysterone from Indian plants. ''Phytochemistry'' **10**: 2225—6.

Horn, D. H. S. 1971 in ''Naturally occurring insecticides'' ed by M. Jacobson and D. G. Crosby, Marcel Dekker Inc. New York pp. 342, 381—404.

Takemoto, T. et al. 1967 Structure of cyasterene A Novel C_{29} Insect-Moulting Substance from Cyathula Capitata ''Terahedron Letters'' **33**: 3191—5.

IDENTIFICATION AND PHYSIOLOGICAL TESTS OF PHYTO-ECDYSONES FROM CHINESE FLORA WITH THE SILKWORM *Bombyx mori* L.

HORMONE SECTION, LABORATORY OF PHYTOCHEMISTRY,
KIANGSU INSTITUTE OF BOTANY,
HORMONE SECTION, LABORATORY OF PHYSIOLOGY AND
PATHOLOGY, KIANGSU INSTITUTE OF SERICULTURE

The physiological activity of the extracts from 107 Chinese plants in shortening the last larval instar of the silkworm *Bombyx mori* L. was first tested through oral administration; and thin layer chromatography was followed to separate the active principles when pronounced effects had been noticed. It is found that *Lamium barbatum* (Family Labiatae) can serve as a new source of phyto-ecdysone which amounts to 0.029% of the dry weight of the whole plant. The instrumental analytical data assign it to be β-ecdysone. The phyto-ecdysones obtained from extraction are to be used in sericultural practice to shorten the last larval instar for regulation of silk production of the silkworm. It is found that to feed the last instar larvae with mulberry leaves sprayed with cyasterone in extravagant dosage (above 5 μg per larva) will give rise to intermediate forms between larvae and pupae while a proper dosage (1.5 μg per larva) will cause to yield normal larvae.